



Målrettet fisketur i hjernen giver ny viden om Fantasys virkningssted

Villumsen, Inge Stengaard; Vogensen, Stine Byskov; Frølund, Bente; Clausen, Rasmus Prætorius; Wellendorph, Petrine

Published in:
Lægemiddelforskning

Publication date:
2011

Document version
Tidlig version også kaldet pre-print

Citation for published version (APA):
Villumsen, I. S., Vogensen, S. B., Frølund, B., Clausen, R. P., & Wellendorph, P. (2011). Målrettet fisketur i hjernen giver ny viden om Fantasys virkningssted. *Lægemiddelforskning*, 2011, 26-28.

Målrettet fisketur i hjernen giver ny viden om Fantasys virkningssted



Vi har udviklet en molekylær fiskestang, som hjælper os til at forstå, hvordan misbrugsstoffet GHB – kendt som Fantasy – virker i hjernen. Med fiskestangen har vi fanget det specifikke protein, som GHB reagerer med i hjernebarken. Dermed bliver det muligt at undersøge stoffets virkning, og om det kan modificeres, så det ikke længere er farligt og kan bruges til at behandle sygdomme.

Af Inge S. Villumsen, Stine B. Vogensen, Bente Frølund, Rasmus P. Clausen og Petrine Wellendorph

GHB er en kemisk forbindelse, der forekommer naturligt i menneskets hjerne, men som er bedst kendt som misbrugsstoffet Fantasy. Når GHB indtages i moderate mængder, medfører det euforiske og afslappende effekter, men i højere doser eller blandet med alkohol kan misbrug af stoffet medføre koma og død. Den naturlige funktion er stadig ukendt, men GHB fungerer sandsynligvis som et signalstof i hjernen. Målet med vores forskning er at karakterisere GHB's bindingssteder i hjernen på molekylært plan og korrelere dem med stoffets fysiologiske og farmakologiske funktion. Hjernens signalstoffer virker ved at binde til og aktivere særlige proteiner, men det vides ikke, hvilket af hjernens proteiner GHB binder sig til. Ved brug af radioaktivt mærkede GHB-lignende stoffer har vi tidligere vist, hvor i hjernen det ukendte protein findes. Men først når selve proteinet er identificeret, kan man for alvor be-

gynde at forstå GHB's rolle i hjernen. Derfor er vi nu gået på fisketur i hjernevæv fra rotter for at få proteinet på krogen.

Den molekylære fiskestang

Vi har brugt medicinskemiske metoder til at udvikle fiskestangen i form af et molekyle, som kan fiske GHB's bindingsprotein ud fra hjernens samlede pulje af proteiner. Kravene til en sådan molekylær fiskestang er, at molekylet skal binde specifikt til det rigtige protein, at det har en krog, som kan hage sig fast i proteinet, og at det indeholder en lampe, som lyser, så man kan detektere fiskestangen og dermed fangsten.

GHB-fiskestangen indeholder forskellige funktionelle grupper, som hver især opfylder disse forskellige krav. Den ene ende af stangen er strukturelt identisk med GHB og fungerer som madding, der sørger for, at fiskestangen binder til det samme protein i hjernen som GHB. Fiskestangen indeholder også to aromatiske ringe, der forstærker stangens tilknytning til proteinet. Eksperimenter har vist, at tilstedeværelsen af ringene medfører, at molekylet binder op til 700 gange stærkere til bindingsproteinet end GHB selv, hvilket medfører, at fiskestangen er selektiv overfor det ønskede protein; det binder ikke til andre af hjernens proteiner.

Fiskestangen fanger proteinet i prøven, mens det har sin naturlige facon. Men derefter opstår der et problem. For når man ønsker at isolere og oprense et protein i laboratoriet, er det normalt nødvendigt at udsætte proteinet for et kemisk miljø, som ødelægger proteinets tredimensionelle struktur.

GHB GENNEM TIDEN: FRA NATURSTOF TIL MISBRUGSSTOF OG LÆGEMIDDEL

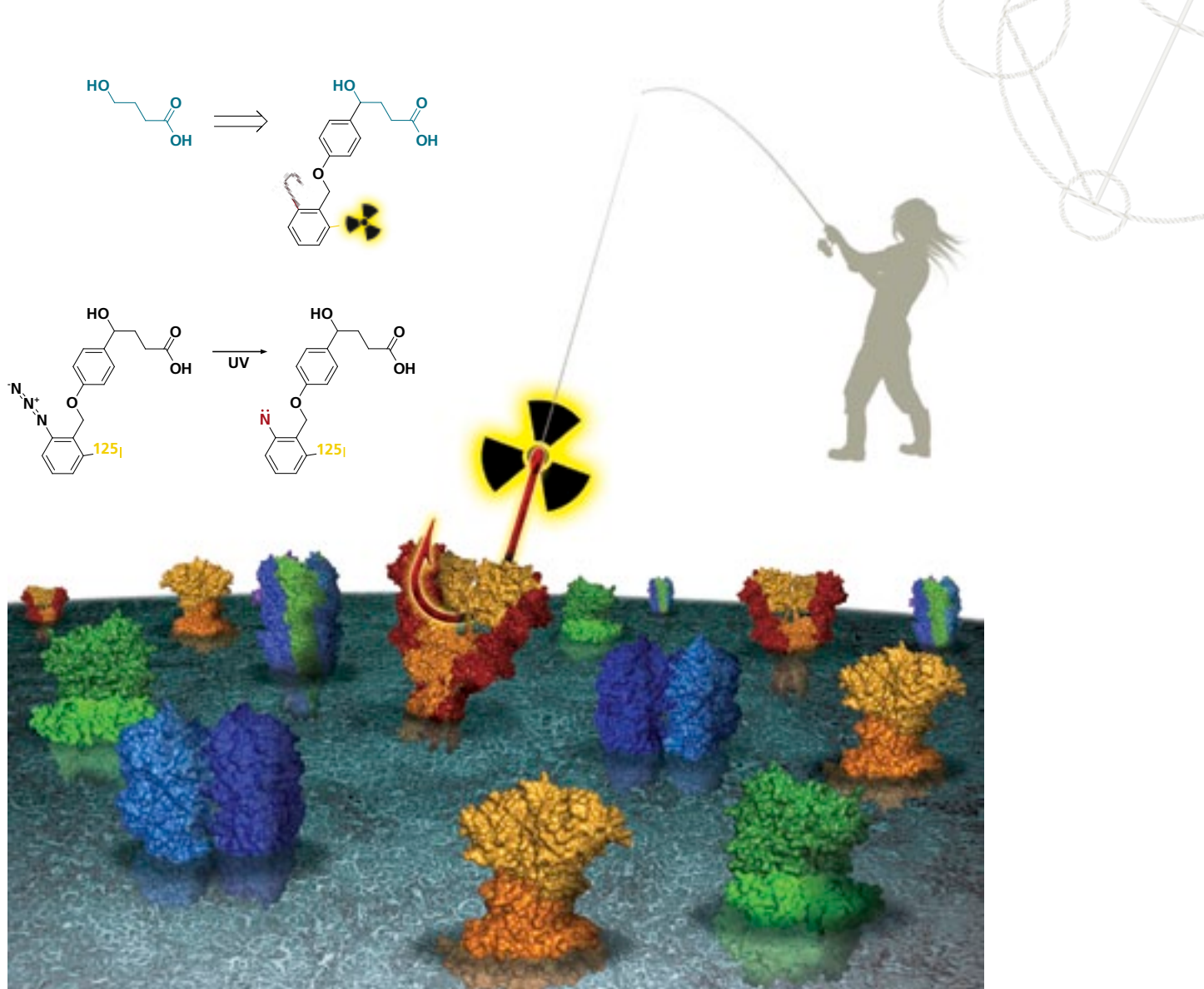
γ -hydroxysmørsyre (GHB) blev første gang beskrevet i 1960'erne som et stof, der let passerer ind i hjernen, hvor det hæmmer nervecellernes signaloverførsel. Man opdagede også, at GHB er naturligt forekommende i hjernen i små mængder, men stoffets fysiologiske betydning er stadig ukendt.

I højere doser er GHB blevet brugt både rekreativt og medicinsk. I Danmark er GHB mest kendt som misbrugsmidlet Fantasy, der anvendes som rus-

middel, som giver euforiske og afslappende effekter, men som i høje doser kan føre til koma og død. GHB er også kendt som et Date Rape Drug, fordi stoffet er blevet brugt som bedøvelsesmiddel ved voldtægter, hvor GHB kommes i offerets drink, uden at det kan smages. Der findes ikke nogen modgift.

Siden 1970'erne har GHB været anvendt medicinsk som bedøvelsesmiddel, til behandling af søvnløshed og til smertelindring ved fødsler. GHB er i dag et registreret lægemiddel mod nogle former for søvnforstyrrelser samt alkoholisme.





På fisketur i hjernen: Søen er en proteinopløsning fra en rottehjerne. Maddingen er et GHB-lignende molekyle, og fisken er det protein, som GHB binder til i hjernen. Når fisken bider på, fanges den på krogen. Ved de efterfølgende analyser i laboratoriet kan proteinet detekteres, fordi det afsløres af en radioaktiv lampe på fiskekrogen. Den molekylære fiskestang er baseret på strukturen af GHB (blå) og designet, så der er plads til to aromatiske phenylringe, som bidrager til proteinets genkendelse af GHB. Krogen er en azidgruppe, $N=N=N$ (sort), som kan fraspalte et kvælstofmolekyle, N_2 , og omdannes til en nitren (rød), når gruppen belyses med ultraviolet lys. Nitrener er meget reaktive og reagerer kemisk med proteinet, hvorved der dannes en stærk kovalent binding. Lampen et radioaktivt atom, jod¹²⁵ (gul), som er placeret på den ene ring.

Under sådanne betingelser kan GHB og GHB-lignende molekyler ikke længere binde til proteinet som en nøgle i en lås, fordi låsen har ændret form.

For at sikre, at vores GHB-maddning ikke falder af bindingsstedet på proteinet under oprensningen, har vi inkorporeret en kemisk azidgruppe i den molekylære fiskestang. Når stangen belyses med ultraviolet lys, reagerer azidgruppen med aminosyrer i proteinet og binder sig kovalent til dem som en fiskekrog, der sætter sig fast i munden på en fisk. Efter denne reaktion kan man udsætte proteinet for de nødvendige forsøgsbetingelser uden at fiskestangen falder af. Derved kan GHB's bindingsprotein adskilles fra de øvrige proteiner i hjernevævet via klassisk separation af proteiner efter størrelse. Den molekylære fiskestangs sidste egenskab er en lampe, som gør det muligt at følge molekylet under forsøgene. Lampen består af en radioaktiv jod-isotop, der udsender et kraftigt signal, som radiofølsomme målere opfanger i form

af lysglimt. Metoden er særdeles følsom og gør det muligt at påvise tilstedeværelsen af molekylet ned til meget små mængder.

Bid i laboratoriet

Ved at udnytte det specialdesignede molekyle er det lykkedes at isolere GHB-bindingsproteinet fra rottehjernevæv og bestemme størrelsen på proteinet. Vi har anvendt vævsmateriale fra det cerebrale cortex, også kaldet hjernebarken, som er det yderste lag af hjernen hos mennesker og højere dyr. Her er der tidligere observeret en høj grad af GHB-binding. Vi kastede fiskestangen ned til blandingen af proteiner fra rottehjernevævet og opnåede en selektiv og stærk binding til bindingsproteinet. Blandingen blev efterfølgende fotoreageret ved belysning med ultraviolet lys, så azidgruppen på fiskestangen kunne reagere med proteinet og fange det på krogen. Herefter blev proteinblandingen analyseret ved at

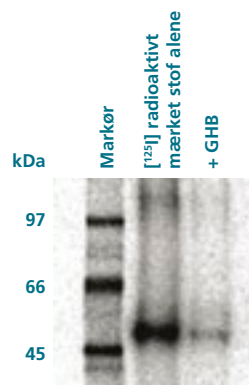
ADSKILLELSE AF PROTEINER VED GELELEKTROFORESE

For at kunne identificere proteinerne i en prøve af fx hjernevæv er det nødvendigt først at denaturere proteinerne og derpå at adskille dem. Det kan opnås med metoden SDS polyakrylamid gelelektroforese (SDS-PAGE).

SDS står for natriumdodekylsulfat, som er et meget anvendt opløsningsmiddel inden for biokemien. Stoffet denaturerer proteiner, dvs. ødelægger deres oprindelige tredimensionelle facon ved at bryde bindinger mellem aminosyrerne og ved at give proteinopløsningen en negativ ladning. Fidusen er, at de denaturerede proteiner nu kan adskilles efter størrelse.

Adskillelsen opnås med polyakrylamid gelelektroforese, hvor proteinblandingen fra prøven anbringes øverst i gelen, som påføres et spændingsfelt. Da proteinerne er negativt ladede, vil de vandre fra den negative katode på toppen af gelen imod den positive anode i bunden af gelen, sådan at de mindste proteiner vandrer hurtigst. Man anbringer oftest en blanding med kendte proteiner i en af yderbrøndene for at have noget at sammenligne med.

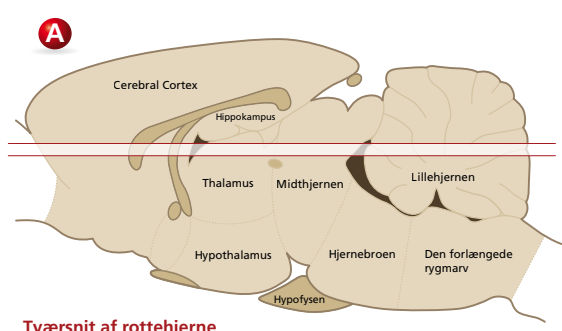
Når proteinerne i prøven er adskilt, viser den radioaktive markør på fiskestangen, hvilket protein GHB binder sig til.



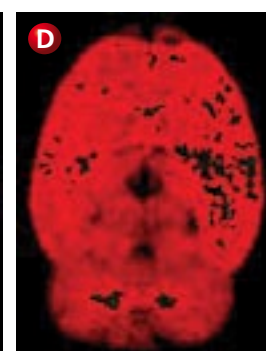
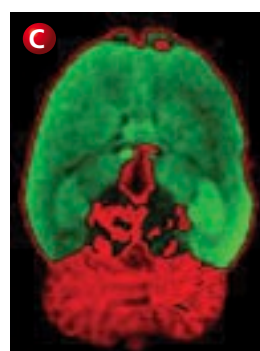
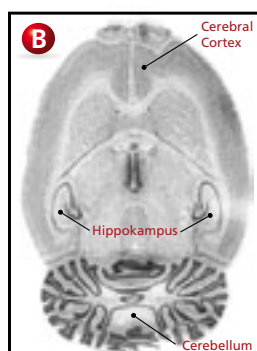
Her ses en gel af proteinopløsningen fra en rotteherje. Det mørke bånd i den centrale brønd repræsenterer det indfangede bindingsprotein, som hænger sammen med den radioaktivt mærkede fiskestang. Til højre kan man se, hvordan tilsætning af en høj koncentration af GHB fortrænger det mærkede stof inden belysning med ultraviolet lys, hvilket bekræfter, at båndet kommer fra et protein, der kan binde GHB. Det GHB-bindende protein har en størrelse på ca. 50 kDa estimeret ud fra forskellige kendte proteins størrelse yderst til venstre i gelbilledet.

sortere proteinerne efter størrelse. Derpå blev proteinet detekteret ved hjælp af den radioaktive jod-isotop, og størrelsen blev målt til at være på omkring 50 kDa. De næste skridt bliver at oprense proteinet yderligere, bestemme aminosyresekvensen og identificere det gen, som koder for proteinet. Når det er lykkedes, bliver det muligt at udtrykke det GHB-bindende protein i pattedyrsceller ved brug af genteknologi og undersøge proteinet isoleret frem for blandt alle hjer-

nens proteiner. Herved vil vi mere præcist kunne bestemme, hvordan proteinet fungerer på det molekylære plan, bygge modeller af proteinet og gå i gang med at designe stoffer, som præcist aktiverer eller hæmmer proteinet. Alt afhængig af, hvilken rolle proteinet spiller i hjernen, vil vores fangst på sigt muliggøre udvikling af stoffer med målrettet effekt mod visse sygdomme i hjernen, men uden de farlige bivirkninger, som Fantasy medfører.



Tværsnit af rotteherje



A Anatomien af en rotteherje. De røde streger markerer det horisontale plan, hvor der er udtaget tynde skiver til bindingsstudierne. **B** En vævsskive med markering af de relevante hjernedele. **C** Den radioaktivt mærkede fiskestang binder til det cerebrale cortex og hippocampus (grønt), men ikke til lillehjernen (rødt). **D** Ved tilstedeværelse af GHB under reaktionen fortrænges det radioaktive stof fra sit bindingssted, og radioaktiviteten aftager. Forskellen mellem **C** og **D** svarer til de specifikke GHB-bindingssteder som overvejende er i cortex og hippocampus.



Stud.scient Inge S. Villumsen er specialestuderende på Institut for Molekylær Lægemiddelforskning og Aarhus Universitet
Ph.d. Stine B. Vogensen er postdoc på Institut for Molekylær Lægemiddelforskning
Ph.d. Bente Frølund er lektor på Institut for Molekylær Lægemiddelforskning
Ph.d. Rasmus P. Clausen er lektor på Institut for Molekylær Lægemiddelforskning
Ph.d. Petrine Wellendorph er lektor på Institut for Molekylær Lægemiddelforskning

